

二甲双胍联合 MCT1 抑制剂 α -氰基-4-羟基苯乙炔 治疗小鼠 Lewis 肺癌的研究

郭福春, 王力强, 张 静, 王永生[△]

四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨二甲双胍联合单羧酸转运蛋白 1(monocarboxylate transporter 1, MCT1)抑制剂 α -氰基-4-羟基苯乙炔(ChC)干扰乳酸代谢是否有抗肿瘤作用。**方法** 体外检测对照组、二甲双胍组(1 mmol/L、5 mmol/L)、ChC 组(5 mmol/L)及联合用药组(二甲双胍 5 mmol/L 和 ChC 5 mmol/L)24、48 h LL/2 细胞的增殖、乳酸代谢的改变及 24 h 细胞凋亡变化。C57BL/6 小鼠于右背侧皮下接种 LL/2 肿瘤细胞(5×10^5 /只),建立小鼠 Lewis 肺癌模型,将 28 只荷瘤小鼠随机平均分为 4 组:对照组(0.1 mL 生理盐水灌胃,同时给予 0.1 mL 生理盐水腹腔注射)、二甲双胍治疗组(二甲双胍灌胃,200 mg/kg,0.1 mL/只,同时给予 0.1 mL 生理盐水腹腔注射)、ChC 治疗组(ChC 腹腔注射,100 mg/kg,0.1 mL/只,同时给予 0.1 mL 生理盐水灌胃)和联合治疗组(同时给予上述剂量二甲双胍灌胃和 ChC 腹腔注射)。观察各组小鼠肿瘤生长、测量体积大小并进行肿瘤组织原位凋亡检测。**结果** 在体外,联合使用二甲双胍和 ChC 可以显著增加肿瘤细胞的乳酸生成,同时抑制肿瘤细胞的增殖,与对照组、二甲双胍组和 ChC 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。体内动物模型证实联合使用二甲双胍和 ChC 可以早期减缓肿瘤的生长,与对照组、二甲双胍组和 ChC 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);同时促进肿瘤细胞的凋亡。**结论** 二甲双胍联合 ChC 可以改变肿瘤细胞乳酸代谢,诱导细胞凋亡,具有一定的抗肿瘤作用。

【关键词】 代谢共生 单羧酸转运蛋白 1 二甲双胍 乳酸 凋亡

Study on the Anti-Lewis Lung Carcinoma Effect of Metformin Combined with MCT1 Inhibitor ChC GUO Fu-chun, WANG Li-qiang, ZHANG Jing, WANG Yong-sheng[△]. *State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

[△] Corresponding author, E-mail: wangy75@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the antitumor effect of the combination of metformin with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (ChC, a MCT1 inhibitor) in the treatment of Lewis lung cancer. **Methods** *In vitro*, the utilization of lactate acid was measured by lactate assay in cultured medium and the inhibition of LL/2 cell proliferation of four groups [control group, metformin group (1 mmol/L and 5 mmol/L), ChC group (5 mmol/L) and the combination group (metformin 5 mmol/L and ChC 5 mmol/L)] was detected in 24 h, 48 h, and their apoptosis in 24 h was also detected. *In vivo*, twenty eight C57BL/6 mice bearing LL/2 (5×10^5) subcutaneous Lewis lung cancer on the right flank was established and then randomly assigned into four groups: control, metformin (200 mg/kg body mass in 0.1 mL i. g. with NS 0.1 mL i. p.), ChC (100 mg/kg body mass in 0.1 mL i. p. with NS 0.1 mL i. g.) and the combination (metformin 200 mg/kg body mass in 0.1 mL i. g. with ChC 100 mg/kg body mass in 0.1 mL i. p.). Tumor volume was measured. The pathologic observation and apoptotic analysis of tumors was assessed by TUNEL assay. **Results** Compared to the control, metformin or ChC alone, combination of two drugs led to a significant lactate acid production in cultured medium and the inhibition of LL/2 cell viability ($P < 0.05$). *In vivo*, the systemic administration of two drugs led to obvious retarded tumor growth compared with used alone in early stage ($P < 0.05$). The TUNEL assay showed the significantly increased number of apoptosis cells in tumor tissues from the combination group. **Conclusion** Combination of metformin and ChC transformed the lactic acid metabolism in LL/2 cells and induced cell apoptosis and showed the antitumor effect.

【Key words】 Metabolic symbiosis Monocarboxylate transporter 1 Metformin Lactic acid Apoptosis

肿瘤细胞即使在有氧情况下,其糖酵解反应也增强,即有氧糖酵解,被称为“Warburg 效应”,使肿

瘤细胞快速获得生长增殖所需的物质和能量。有氧糖酵解会产生大量乳酸,乳酸一方面可以促进肿瘤的生长,但过量的乳酸堆积则会直接抑制肿瘤细胞增殖,诱导细胞凋亡^[1-3]。最近的研究发现,肿瘤细

[△] 通讯作者, E-mail: wangy75@gmail.com

胞表面可以高表达单羧酸转运蛋白1(MCT1),将乳酸转入肿瘤组织有氧细胞胞内,减少胞外乳酸堆积并为肿瘤细胞提供能量,有限的葡萄糖则优先供给乏氧细胞,形成一种有利于肿瘤生长的代谢共生关系^[4]。在这个过程中,单羧酸转运蛋白(MCT)起着关键性的作用。人鳞癌、乳腺癌、头颈部肿瘤及结肠癌中均发现MCT1的高表达,在小鼠Lewis肺癌细胞株LL/2细胞膜上也检测到其表达^[4]。 α 氰基-4-羟基苯乙炔(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHC)是一种MCT1抑制剂可以抑制MCT1,阻断乳酸的转运。二甲双胍是一种广泛使用的双胍类抗糖尿病药物,体内外的大量实验已证明它可以调节细胞的能量代谢^[5],促进肿瘤细胞的糖酵解和乳酸生成。

本实验拟通过二甲双胍促进肿瘤细胞(特别是有氧细胞)的糖酵解,增加细胞对葡萄糖的利用及乳酸的生成,同时给予CHC,阻断乏氧细胞和有氧细胞之间的代谢共生关系以干扰肿瘤的乳酸代谢,观察联合使用二甲双胍和CHC的抗肿瘤效果。

1 材料与方法

1.1 材料

LL/2小鼠Lewis肺癌细胞株由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室保存;DMEM培养基、胎牛血清(FBS)均购自美国GibicoBRL公司;二甲双胍、CHC、MTT、碘化丙啶(PI)、DMSO溶液购自Sigma公司;乳酸检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TUNEL试剂盒(The DeadEndTMFluorometric TUNEL System)购于Promega公司。C57BL/6雌性小鼠(6~8周龄)购自四川大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞的培养 LL/2细胞株于DMEM完全培养基中培养,含10%FBS、100 μ g/mL链霉素、100 U/mL青霉素,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂无菌孵箱中。

1.2.2 体外实验

1.2.2.1 药物分组 分为二甲双胍1 mmol/L组、二甲双胍5 mmol/L组、CHC 5 mmol/L组及联合给药(5 mmol/L二甲双胍和5 mmol/L CHC)组。

1.2.2.2 细胞上清乳酸检测 每组加入LL/2细胞,每个浓度设3个复孔,24、48 h后分别收集细胞上清,各取20 μ L,同时设空白管和标准管,加入酶工作液1 mL、显色剂0.2 mL,混匀,37 $^{\circ}$ C水浴准确

反应10 min,2 mL终止液终止,混匀,530 nm,1 cm光镜,蒸馏水调零,测各管光密度(OD)值。计算方法:乳酸(LD)含量(mmol/L) = $(OD_U - OD_B) \div (OD_S - OS_B) \times C_S \times N$,式中,OD_U:测定管OD值;OD_B:空白管OD值;OD_S:标准管OD值;C_S:标准浓度(3 mmol/L);N:样品测试前稀释倍数。相对乳酸浓度=乳酸浓度/活细胞比值。

1.2.2.3 细胞增殖能力检测 为了研究二甲双胍和CHC对肿瘤细胞生长和存活的影响,我们用二甲双胍和CHC处理LL/2细胞,MTT法检测。对数生长期的LL/2细胞接种于96孔板,第2 d加入各组中(以不加任何药物的细胞为对照组),每个浓度设5个复孔。于24、48 h后,每孔加入20 μ L MTT溶液(5 mg/mL,最终形成0.5% MTT),继续培养4 h,吸去孔内培养液,每孔加入150 μ L DMSO,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪上振荡10 s,于495 nm处测量各孔的OD值。肿瘤细胞的增殖率(%) = 实验组OD值/对照组OD值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 体内实验

1.2.3.1 动物模型的建立、分组及处理方法

C57BL/6小鼠于右背侧皮下接种LL/2肿瘤细胞,每只接种 5×10^5 个细胞,共接种1次。接种后第4 d,将28只C57雌性小鼠随机分为4组,每组7只。对照组为生理盐水组,各用0.1 mL生理盐水灌胃和腹腔注射。参考文献^[1, 4, 5]选择体内给药的药物剂量:二甲双胍组用二甲双胍灌胃,200 mg/kg,0.1 mL/只,同时给予0.1 mL生理盐水腹腔注射;CHC组用CHC腹腔注射,100 mg/kg,0.1 mL/只,同时给予0.1 mL生理盐水灌胃;联合组同时给予二甲双胍(200 mg/kg,0.1 mL/只)灌胃和CHC(100 mg/kg,0.1 mL/只)腹腔注射。

1.2.3.2 肿瘤体积测定 给药后(接种后第5 d),用游标卡尺测量肿瘤最长径及宽径,每3 d测量1次,肿瘤体积(mm³) = $0.52 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{宽}$ 。

1.2.3.3 肿瘤组织原位凋亡检测 为了进一步验证联合用药是否可以增加细胞凋亡,取肿瘤组织,用TUNEL凋亡检测试剂盒检测原位组织凋亡。在肿瘤体积出现有统计学意义的组间差异即给药后第6 d时,断颈处死小鼠,剥离取出肿瘤组织,固定于中性福尔马林溶液中。固定好后进行石蜡包埋和切片。所有操作按照TUNEL试剂盒说明书进行。荧光显微镜下蓝色光激发,TUNEL凋亡细胞染色阳性,细胞核呈现绿色,而阴性细胞胞核无着色。分

别于低倍和高倍荧光显微镜下观察凋亡。

1.2.4 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间资料的比较采用单因素方差分析,两组间资料比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体外实验结果

2.1.1 二甲双胍联合 CHC 对细胞乳酸代谢的影响 二甲双胍随着药物浓度的增加,胞外的乳酸浓度升高($P < 0.05$),但对比 24 h 和 48 h 两个时间点,变化不大。单独给予 CHC 时,细胞上清乳酸水平也明显升高,且随着时间的推移,乳酸的含量也在

不断增加(P 均 < 0.05)。当联合给药时,胞外的乳酸显著增加,48 h 时,乳酸水平是对照组的 2.6 倍,与单独使用二甲双胍和 CHC 相比差异也具有统计学意义(P 均 < 0.05)。见图 1。

2.1.2 二甲双胍联合 CHC 对细胞增殖活性的影响 如图 2 所示,与对照组比较,二甲双胍和 CHC 单独对 LL/2 细胞均具有较明显的抑制作用($P < 0.05$)。随着浓度的增加和/或时间的延长,二甲双胍和 CHC 的作用增强($P < 0.05$)。与其余 3 组比较,联合处理时,对肿瘤细胞的抑制作用更加明显($P < 0.05$),在 24、48 h 细胞增殖率分别为 $(50 \pm 2.1)\%$ 和 $(25 \pm 1.4)\%$ 。

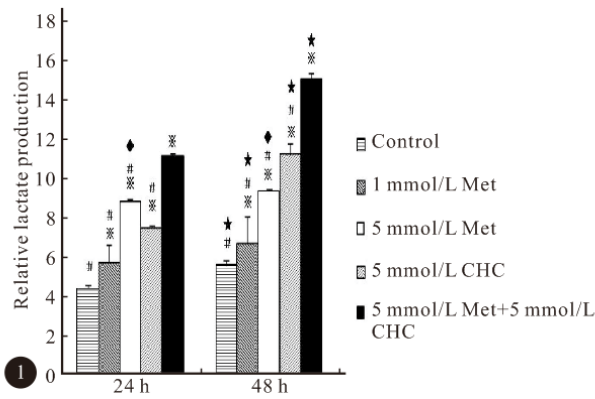


图 1 联合用药促进肿瘤细胞乳酸生成

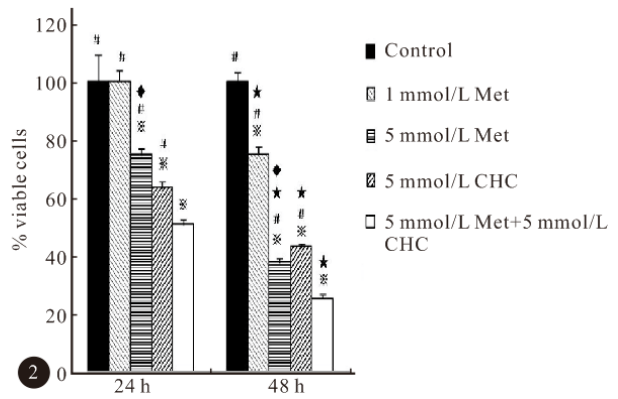


图 2 肿瘤细胞增殖检测

Fig 1 The combination of metformin (Met) and CHC increased lactate production

Fig 2 Proliferation assay for tumor cells

The relative lactate production = lactate concentration/relative cell viable. * $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. 5 mmol/L Met+5 mmol/L CHC; ★ $P < 0.05$, vs. 24 h in the same group; ◆ $P < 0.05$, vs. 1 mmol/L Met group

2.2 体内实验结果

2.2.1 二甲双胍和 CHC 对肿瘤生长的影响 在体内,单独给予二甲双胍和 CHC 均可以减缓肿瘤生长。在给药后第 6 d 和第 9 d,联合组和其余 3 组间肿瘤体积差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

在对照组中,没有发现明显的细胞凋亡,二甲双胍组和 CHC 组中可观察到散在的细胞凋亡,而联合用药组存在着广泛的细胞凋亡。见图 4。

3 讨论

肿瘤细胞相对于其来源的正常细胞的代谢改变被认为是其无限增殖能力的基础。它们与众不同的代谢方式使得它们得以维持一个较高的增殖率和抵抗一些——特别是不断增加的氧化损伤导致的细胞死亡^[6]。越来越多的实验证明,改变肿瘤的代谢状态可以抑制肿瘤生长^[7, 8]。

本实验设想通过靶向肿瘤的乳酸代谢抑制肿瘤生长。在体外研究中我们发现,与先前报道一样,二甲双胍单独可以抑制肿瘤细胞增殖,调节细胞代谢,增强糖酵解。在对 CHC 研究中发现,它可以显著增加乳酸生成。在体外同时给予二甲双胍和 CHC 时,乳酸生成和肿瘤抑制作用明显高于单独处理组;通过对肿瘤组织的原位凋亡检测发现,联合组内亦

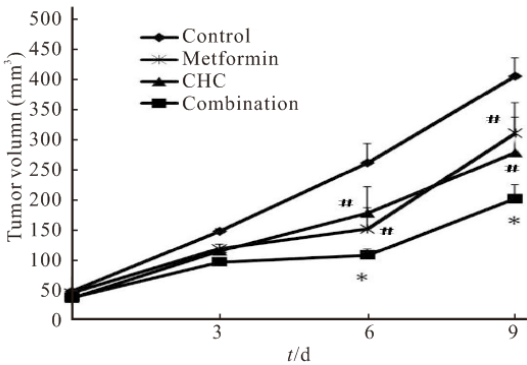


图 3 肿瘤生长曲线

Fig 3 Tumor growth curve

* $P < 0.05$, vs. the other three groups; # $P < 0.05$, vs. control group

2.2.2 肿瘤组织原位凋亡分析 给药后的第 6 d,

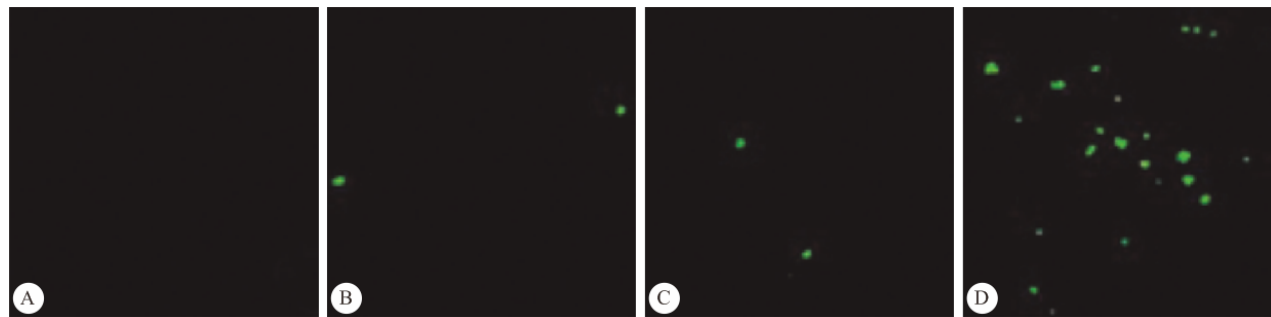


图 4 肿瘤组织 TUNEL 染色。×200

Fig 4 Staining of tumor tissues, TUNEL ×200

A: Control group; B: Metformin group; C: CHC group; D: Combination group

存在广泛的细胞凋亡。在荷瘤小鼠模型中,本研究也显示干扰肿瘤的乳酸代谢可在早期减缓肿瘤的生长。本实验初步证实了靶向肿瘤的乳酸代谢可以减缓肿瘤的生长,但将干扰乳酸代谢作为一个治疗方向,则需要更多的动物模型及长期疗效的验证,且许多研究发现乳酸对肿瘤生长的促进作用。乳酸的堆积会破坏肿瘤组织间质,促进肿瘤侵袭和转移^[9, 10]。肿瘤微环境中乳酸的升高、pH 降低亦可抑制机体的效应 T 细胞^[11]、调节 DC 细胞分化^[12],导致肿瘤免疫逃逸。此外,最新的研究还发现,乳酸还具有促进肿瘤血管生成的作用^[13]。因此,乳酸的堆积在一定程度上会降低药物的抗肿瘤作用。

综上所述,本研究证实,靶向肿瘤组织的乳酸代谢可以抑制肿瘤的生长,若和其它方法如抗血管治疗联合或许能取得更好的效果。

本研究虽初步证实了靶向乳酸代谢对肿瘤的抑制作用,但仍有许多问题需要解决,如二甲双胍和 CHC 是如何抑制细胞的增殖、靶向肿瘤代谢后肿瘤细胞及组织的代谢变化及其对肿瘤生物学行为的影响等。在下一步的研究中,将对二甲双胍和 CHC 的抗肿瘤机制、乳酸增加是否可以直接改变肿瘤细胞的代谢方式即乳酸对肿瘤细胞的作用以及代谢改变对肿瘤细胞的长期影响做进一步的研究。

参 考 文 献

- Weng XC, Zheng JQ, Jin QE, *et al.* Inhibition of acid-induced apoptosis by targeting ASIC1a mRNA with short hairpin RNA. *Acta Pharmacol Sin*, 2007; 28(10): 1621-1627.
- Coss RA, Storck CW, Daskalakis C, *et al.* Intracellular acidification abrogates the heat shock response and compromises survival of human melanoma cells. *Mol Cancer Ther*, 2003; 2(4): 383-388.
- Furlong IJ, Ascaso R, Lopez Rivas A, *et al.* Intracellular

acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity. *J Cell Sci*, 1997; 110 (5): 653-661.

- Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, *et al.* Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*, 2008; 118(12): 3930-3942.
- Zhou G, Myers R, Li Y, *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 2001; 108(8): 1167-1174.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, *et al.* The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 2008; 7(1): 11-20.
- Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, *et al.* Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2010; 70(6): 2465-2475.
- Pedersen P. The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: an overview. *J Bioenerg Biomembr*, 2007; 39(1): 1-12.
- Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, *et al.* Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res*, 2006; 66 (13): 6699-6707.
- Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, *et al.* Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res*, 2006; 66 (10): 5216-5223.
- Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, *et al.* Inhibitory effect of tumor cell derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 2007; 109(9): 3812-3819.
- Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, *et al.* Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*, 2006; 107(5): 2013-2021.
- Végran F, Boidot R, Michiels C, *et al.* Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- κ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 2011; 71(7): 2550-2560.

(2012-10-09 收稿, 2013-02-22 修回)

编辑 吕 熙